

## **ПЕРЕВАГИ І НЕДОЛІКИ РІЗНИХ МЕТОДІВ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ ПТИЦІ**

Даценко К.В. <sup>1</sup>

Державний науково-контрольний інститут біотехнології  
і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ), м. Київ

*У статті наведені дані про різні методи сучасної лабораторної діагностики інфекційного бронхіту птиці, їх переваги та недоліки.*

Інфекційний бронхіт курей (Avian infectious bronchitis) – гостре високонтагіозне захворювання курей різних вікових груп, яке викликається коронавірусом та характеризується ураженням респіраторних органів і нирок у курчат та репродуктивних органів у дорослої птиці. Вперше захворювання було описано Шалком і Хауном (США) у 1931 році [6]. З початку 60-х років захворювання реєструється по всьому світу. Використання вакцин на основі атенуйованих штамів серотипу Массачусетс (Н-120 і Н-52 та ін.) сприяло успішній боротьбі з ІБК у багатьох країнах. Однак з кінця 70-х років у деяких країнах Європи, а в США ще раніше, спалахи захворювання почали реєструвати у вакцинованій птиці, а дослідження польових ізолятів призвели до виявлення нових серотипів[2].

На сьогодні в світі відомо більше 60 серотипів вірусу ІБК [7]. Найбільш поширені серотипи: Массачусетс, Коннектикут, Флорида, Арканзас, ІМК, Джорджия, Delaware (DE 072/92), Каліфорнія, Айова 97, Айова 609, Грей, Армілайнд, Брисбери – США; Нідерланди – серотипи Д з різним цифровим значенням; Австралія – В і С; Великобританія – UK/123/82, 6/82, 167/84, 142/86; Японія – KB8523 [1, 3].

Спалахи захворювання на інфекційний бронхіт курей (ІБК) – це одна з багатьох проблем промислового птахівництва. В останні роки вакцинопрофілактика ІБК не завжди забезпечує надійний захист поголів'я птиці. Насамперед це пов'язано зі значною генетичною мінливістю вірусу, що призводить до появи великої кількості нових серотипів, перехресний захист між якими слабкий або взагалі відсутній. Тобто птиця привита вакцинним штамом не завжди має захист від циркулюючого в даному регіоні польового штаму вірусу ІБК. З метою оптимізації програм вакцинації необхідно проводити своєчасну лабораторну діагностику ВІБК в господарствах [4].

Клінічні симптоми при інфекційному бронхіті птиці можуть проявлятися у різних формах: респіраторній, нефрозно-нефритній та репродуктивній.

Діагноз в умовах господарства ставлять на основі епізоотичних, клінічних і патолого-анатомічних досліджень. З метою постановки остаточного діагнозу проводять лабораторні дослідження.

Для досліджень на інфекційний бронхіт курей до лабораторії ветеринарної медицини направляють свіжі трупи або хвору птицю (5-10 голів).

<sup>1</sup> Науковий керівник — Головка А.М., віце-президент УААН, доктор ветеринарних наук, професор, академік УААН, радник з питань науки і технологій, голова ТК 149.

При респіраторній формі прояву захворювання патматеріалом для виділення вірусу є слизова оболонка трахеї та легенів. Крім того, при інших формах прояву захворювання вірус виділяють з тканин нирок, яйцепроводів, мигдаликів сліпої кишки. Від птиці з нефритом або порушенням репродуктивної функції одночасно із тканинами трахеї та легенів в лабораторію надсилають зразки нирок, яйцепроводів.

Для вірусологічних досліджень від живої птиці відбирають проби змивів з трахеї, гортані. Для проведення серологічних досліджень необхідно взяти не менше 10 проб сироваток крові з шашника, де виявлено хворобу.

Патматеріал до лабораторії направляють у спеціальних контейнерах, охолодженим на льоду або замороженим при довготривалому перевезенні. Проби змивів з верхніх дихальних шляхів від живої птиці та шматочки трахеї і легенів від хворих птахів транспортують у середовищі з додаванням пеніциліну (10000 [МО]/мл) та стрептоміцину (10 мг/мл). Усі зразки патологічного матеріалу необхідно якомога швидше заморозити і направити в лабораторію для досліджень [1,8].

Лабораторна діагностика інфекційного бронхіту курей базується на ізоляції вірусу на курячих ембріонах (при зараженні в алантоїсну порожнину, амніон або на ХАО) або на культурі трахеї курячих ембріонів. Тільки деякі штами вірусу вдається вирощувати в первинній культурі клітин нирок, легенів, печінки курячих ембріонів, в фібробластах курячих ембріонів, ВНК-21 та нирках мавп. Цитопатогенна дія вірусу проявляється у вигляді багатоядерних гігантських клітин. Клітинні культури не використовують для первинної ізоляції вірусу, оскільки необхідно спочатку адаптувати вірус на курячих ембріонах, перш ніж він проявить ЦПД на культурі клітин [8].

З метою експрес-діагностики використовують: РІФ, РГА та електронну мікроскопію.

Реакція імунофлюоресценції (РІФ) полягає в тому, що антитіла, зв'язані з флюорохромом, вступають у специфічний зв'язок із гомологічним антигеном. Утворюється комплекс антиген – антитіло, який виявляється за допомогою люмінесцентного мікроскопа. За допомогою РІФ російські вчені вивчали розподіл вірусного антигену в організмі курчат 80- та 180-денного віку, які були експериментально заражені штамом М41 вірусу ІБК (Сухарев О.І. та соавт., 1976) [2].

Реакцію гемаглютинації (РГА) використовують для виявлення вірусних гемаглютининів (білок в оболонці вірусу) в патматеріалі. Явище гемаглютинації обумовлено склеюванням еритроцитів крові за допомогою вірусу. Механізм його полягає в тому, що одна вірусна частинка за допомогою свого гемаглютиніну адсорбується одночасно на двох еритроцитах, утворюючи «місток» між ними, в результаті чого еритроцити склеюються між собою і випадають в осад у вигляді розкритої парасольки. РГА швидкий і недорогий тест і при деяких обставинах може дозволяти виявлення інфекції, що викликана антигенно різними штамами вірусу ІБК. Але не всі штами вірусу інфекційного бронхіту птиці мають гемаглютинуючі властивості, тому цей тест не може давати 100 % достовірного результату [1, 3].

Електронна мікроскопія дозволяє виявляти частинки з типовою коронавірусною морфологією в алантоїсній рідині або органних культурах; вивчати морфологію вірусів. Електронна мікроскопія використовується в основному в дослідних цілях. Електронний мікроскоп – складний і дорогий прилад, в діагностичних ветеринарних лабораторіях його немає, хоча дослідження з його допомогою – дуже ефективний експрес-метод для виявлення коронавірусних та інших інфекцій. Якщо в матеріалі міститься не менше  $10^7$  віріонів на 1 мл, він не потребує додаткових методів очищення і концентрації [8].

З метою ідентифікації вірусу застосовують серологічні та молекулярно-біологічні методи діагностики.

Серологічну ідентифікацію вірусу здійснюють у реакції дифузної преципітації в агаровому гелі (РДП), реакції затримки гемаглютинації (РЗГА), реакції нейтралізації (РН) на курячих ембріонах, які розвиваються, а також в ІФА (ELISA)[8].

Реакція дифузної преципітації (РДП) заснована на властивості специфічних антитіл сироватки крові та специфічних вірусних антигенів дифундувати в товщі агарового гелю назустріч одне одному, в результаті чого утворюється комплекс антиген – антитіло. Цей комплекс не дифундує в агарі, а випадає в осад на місці утворення у вигляді лінії преципітації. Цей тест має недоліки в чутливості і може давати сумнівні результати; тривалість преципітації антитіл може змінюватися в залежності від індивідуальних особливостей птахів.

Реакція затримки гемаглютинації (РЗГА) ґрунтується на тому, що антитіла специфічної сироватки, яка є гомологічною вірусу інфекційного бронхіту курей, нейтралізують його гемаглютинуючу активність. Тому еритроцити, внесені в суміш сироватки з вірусом, пізніше не склеюються і гемаглютинація затримується. РЗГА дозволяє перевірити наявність ВІБ, а також застосовується для серотипізації і оцінки раннього ефекту від вакцинації. Цей тест використовується для контролю серологічного статусу стада і контролю напруги поствакцинального імунітету [4, 8].

Принцип реакції нейтралізації (РН) полягає у здатності специфічних антитіл доволі міцно приєднуватися до вірусної частинки. За допомогою РН проводять серотипізацію вірусів ІБК на КЕ, органних та клітинних культурах. Також застосовувалась на практиці нейтралізація флуоресцентних фокусів для диференціації штамів ВІБК. РН високоспецифічна, її результати найбільш достовірні при наявності набору стандартних антигенів і сироваток, в той час як в РЗГА доволі часто бувають антигенні перехрести. Хоча РН найбільш чутливий за інші метод, але матеріально-технічне забезпечення перешкоджає його широкому поширенню на практиці. Взагалі, для стандартного серологічного дослідження РН занадто дорогий і непрактичний тест [1].

Імуноферментний метод діагностики (ІФА) застосовують для виявлення та ідентифікації вірусу і антитіл до нього (у тварин-реконвалесцентів) або визначення рівня поствакцинальних антитіл. Метод ELISA найбільш чутливий серологічний тест і дає найбільш ранні реакції і більш високі титри антитіл, ніж інші тести. Перевагою цього тесту є ви-

сока чутливість, швидкість виконання і можливість досліджувати одночасно велику кількість сироваток. Недолік полягає у типоспецифічності відносно штаму ВІБК, але підходить для контролю імунної відповіді на вакцинацію в польових умовах [4].

Окрім того, для диференціації вакцинних штамів вірусу від польових може бути корисним метод використання моноклональних антитіл. Моноклональні антитіла (МАт), які звичайно використовуються в імуноферментному аналізі (ELISA), корисні для типізації і диференціації штамів ВІБК. Обмеження у використанні МАт в аналізі диктуються постійною трансформацією серотипів ВІБК, що примушує конструювати нові і нові гібридами для отримання нових видів антитіл. Імуногістохімія з груповими моноклональними антитілами може використовуватись з метою ідентифікації вірусу інфекційного бронхіту в пробах інфікованих на ХАО[7].

Отже, кожне серологічне дослідження має свої переваги і недоліки, що різняться за часом постановки реакції, за практичністю, специфічністю, чутливістю і вартістю. РЗГА і ELISA підходять для стандартної серології, хоча вони і різняться за специфічністю. РН і РЗГА – класичні методи діагностики ІБК. Хоча РЗГА поступається чутливістю, а РН трудомісткістю ІФА вони є серотипоспецифічними і, в основному, їх використовують для виявлення антитіл до певних серотипів вірусу ІБК. ELISA доступний у вигляді комерційних наборів з інструкціями по їх використанню [4].

Серед молекулярно-біологічних методів ідентифікації ВІБК все більшого розповсюдження набуває застосування ЗТ – ПЛР з послідуочим нуклеотидним секвенуванням. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – перспективний напрямок діагностики, який дозволяє швидко і специфічно виявляти вірусний генем в різних пробах і точно встановлювати штамову належність вірусів ІБК. Принцип методу полягає у ампліфікації ДНК за допомогою Таq-ДНК-полімерази, яка здійснює синтез взаємно комплементарних ланцюгів ДНК, починаючи з двох праймерів [6].

Генотипізація ВІБ здійснюється за допомогою РТ – ПЛР, який стає все більш доступним методом. Наявність ВІБ в алантоїсній рідині КЕ може бути виявлена за допомогою РТ – ПЛР або за допомогою гібридизації ДНК-зондами. Метод ДНК-зондів (гібридизація) полягає у властивості одониткових молекул нуклеїнових кислот взаємодіяти із комплементарними нитками і утворювати дwonиткові молекули. Гібридизація здійснюється на нітроцелюлозній мембрані, досліджувану суспензію клітин лізують для звільнення нуклеїнових кислот. ДНК денатурують, а одониткові молекули, які утворилися, переносять на мембрану, де вони ковалентно зв'язуються з ДНК-зондом, який являє собою мічені ізотопом або ферментом денатуровані молекули нуклеїнової кислоти. Гібридизація відбудеться за умови гомології між зондом і ниткою ДНК [3, 8].

Перевагами ПЛР є висока чутливість, яка дозволяє виявляти навіть поодинокі частинки збудника, незалежно від їх природи за 1 – 2 години; висока специфічність – виявляється характерний тільки для даного збудника фрагмент ДНК; швидкість отримання результату – увесь процес займає 3 – 4 години [3].

**Висновки.** Існує досить багато лабораторних методів діагностики вірусу інфекційного бронхіту птиці, кожен з яких має свої переваги і недоліки. В зв'язку з актуальністю проблеми поширення ІБК основними критеріями під час вибору методів для виявлення та ідентифікації вірусів залишаються високоспецифічність, чутливість і швидкість застосовуемого тесту. Серологічні методи діагностики дозволяють ідентифікувати збудника в патматеріалі, визначити титр антитіл в сироватках крові, але кожне серологічне дослідження має свої переваги і недоліки, що різняться за часом постановки реакції, за практичністю, специфічністю, чутливістю і вартістю.

Молекулярно-біологічні методи дозволяють швидко з високою чутливістю і специфічністю ідентифікувати вірус, визначити його штамову приналежність та генетичну структуру, проте не дають змоги визначити титр антитіл до досліджуемого інфекційного агенту. Отже, діагностика вірусу інфекційного бронхіту повинна бути комплексною із застосуванням як серологічних, так і молекулярно-біологічних методів.

#### Список літератури

1. Борисов, А.В., Инфекционный бронхит кур – актуальная проблема птицеводства / А.В. Борисов, С.В. Фролов, Т.В. Хлыбова и др. // Междунар. конф. по птицеводству. – Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ», 2006. – С.56-64. 2. Бочков, Ю.А. Изучение инфекционного бронхита кур в России: исторический аспект / Ю.А. Бочков, Г.В. Батченко, Н.Н. Луговская и др. // Междунар. конф. «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных». – Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ», 2003. – С.294-302. 3. Бочков, Ю.А. Филогенетический анализ изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в России / Ю.А. Бочков, А.В. Борисов, Л.О. Щербакова, В.В. Дрыгин // Аграрная Россия. – 2002. – №2. – С.11-16. 4. Бочков, Ю.А. Диагностика инфекционного бронхита кур / Ю.А. Бочков, А.В. Борисов, С.В. Фролов и др. // Ветеринария. – 2003. – №4. – С.21-24. 5. Спасов, А.М. Розробка дослідних зразків інактивованих вакцин проти інфекційного бронхіту курей та вивчення їх імуногенної активності / А.М. Спасов, Є.В. Герман, С.І. Вовк, В.В. Герман // Ветеринарна медицина. – Харків: міжвід. темат. наук. зб. – 1999. Вип. 76. – С.102-107. 6. Karaca K. Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes / K. Karaca, S.A. Naqi, J. Jr. Gelb // Avian Dis. – 1992. – Vol. 36. – P. 903 - 915. 7. Chang-Won Lee. Jackwood Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene / Lee Chang-Won, Hilt A. Deborah, W. Mark // J. Vet. Diagn. Invest. – 2003. – Vol. 15. – P. 344-348. 8. Chapter 2.3.2. Avian infectious bronchitis [Електронний ресурс] // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009. – Режим доступу до вид.: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.02\\_AIB.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.02_AIB.pdf).

#### ADVANTAGES AND LACKS OF DIFFERENT METHODS OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS

Datsenko K. V.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Microorganisms  
(DNKIBSHM), Kyiv

*Data about the various modern methods of laboratory diagnostics of avian infectious bronchitis, their advantages and lacks are presented in the paper.*